

2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-342198

(P2001-342198A)

(43) 公開日 平成13年12月11日 (2001. 12. 11)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト <sup>*</sup> (参考)
C 0 7 K 1/113	Z N A	C 0 7 K 1/113	Z N A
14/47		14/47	
C 1 2 P 21/00		C 1 2 P 21/00	C
// C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2001-99706 (P2001-99706)

(22) 出願日 平成13年 3 月30日 (2001. 3. 30)

(31) 優先権主張番号 特願2000-97891 (P2000-97891)

(32) 優先日 平成12年 3 月30日 (2000. 3. 30)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目 1 番 1 号

(72) 発明者 山田 隆央

大阪府松原市一津屋 4 丁目 3 番 26 号

(72) 発明者 辻 勇

大阪府箕面市瀬川 5 丁目 13 番 27 号

(72) 発明者 松井 英起

茨城県つくば市並木 4 丁目 16 番地 1 ガー

デンヒルズ並木 708 号

(74) 代理人 100114041

弁理士 高橋 秀一 (外 1 名)

(54) 【発明の名称】 組み換え型タンパク質の製造方法

(57) 【要約】

・【課題】 活性なタンパク質の製造方法の提供。

・【解決手段】 遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させたタンパク質を、還元電位が -331 mV より大きい還元剤を約 0.1 mM ~ 約 50 mM の濃度で含有する溶液を用いて抽出し、メルカプト基を有さないアミノ酸またはその塩を含有する溶液中でリフォールディングすることを特徴とする活性型タンパク質またはその塩の製造方法など。

・【効果】 本発明の製造方法を用いることにより、原核細胞中に発現した組み換え型タンパク質の不活性体を効率よく活性化でき、上記のような作用を有する生物学的、薬理学的に活性な組み換え型タンパク質を大量に調製できる。

(2)

1

・【特許請求の範囲】

・【請求項1】遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させたタンパク質を、還元電位が $-331\text{mV}$ より大きい還元剤を約 $0.1\text{mM}$ ～約 $50\text{mM}$ の濃度で含有する溶液を用いて抽出し、メルカプト基を有さないアミノ酸またはその塩を含有する溶液中でリフォールディングすることを特徴とする活性型タンパク質またはその塩の製造方法。

・【請求項2】①メルカプト基を有さないアミノ酸またはその塩および②還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオン、システインおよびシスチン、またはシステアミンおよびシスタミンを含有する溶液中でリフォールディングすることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

・【請求項3】タンパク質がFasリガンド様タンパク質である請求項1記載の製造方法。

・【請求項4】Fasリガンド様タンパク質がTL4である請求項3記載の製造方法。

・【請求項5】還元剤がメルカプト基を有する化合物である請求項1記載の製造方法。

・【請求項6】メルカプト基を有する化合物が2-メルカプトエタノールまたはシステアミンである請求項5記載の製造方法。

・【請求項7】メルカプト基を有さないアミノ酸がアルギニンである請求項1記載の製造方法。

・【請求項8】タンパク質を遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、還元電位が $-331\text{mV}$ より大きい還元剤を約 $0.1\text{mM}$ ～約 $50\text{mM}$ の濃度で含有し、かつタンパク質変性剤を含む溶液を用いて該タンパク質を該細胞から抽出・可溶化し、ついでメルカプト基を有さないアミノ酸またはその塩を含有するリフォールディング溶液中で変性剤を不作用濃度まで希釈することを特徴とする請求項1記載の製造方法。

・【発明の詳細な説明】

・【0001】

・【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子組み換え技術を用いて原核細胞中で発現させたタンパク質に対して、低濃度（約 $0.1\text{mM}$ ～約 $50\text{mM}$ 、好ましくは約 $0.1\text{mM}$ ～約 $10\text{mM}$ ）の弱い還元剤（還元電位が $-331\text{mV}$ より大きい還元剤）の存在下での変性可溶化、およびリフォールディング操作を施すことにより、生物学的に活性な組み換え型タンパク質を効率的に製造する方法などに関する。

・【0002】

・【従来の技術】多細胞生物は、その恒常性を保つために細胞の増殖と死を巧妙にコントロールしている。個体発生の過程では、多くの細胞が細胞死によって除去され、また、成体においても臓器、組織を構成する細胞は常に増殖と死のバランスを保ちながら、その機能を維持している。こうした際の細胞死は、予め予定された死、“Programmed Cell Death”であるとされており、物理的・化

2

学的要因で不慮に起こる細胞死であるネクロシス (Necrosis、壊死) とは形態学的に明確に区別されたアポトーシス (Apoptosis) の過程を経て起こることが知られている。これまでにアポトーシスが関与する多くの生理的、病理的現象が明らかにされてきており、細胞のアポトーシスを誘導あるいは抑制することにより、各種疾患の診断、予防および治療を図る試みも盛んに行われている (サイエンス (SCIENCE) 267, 1456-1462, 1995)。アポトーシスは当業界で特に注目されている生命現象の一つである。

・【0003】アポトーシスは種々の生理的条件下で誘導されるが、中でもFas抗原 (CD95, APO-1) は免疫系の細胞に死を誘導する分子として近年注目を集めている (サイエンス (SCIENCE) 267, 1449-1456, 1995)。Fas抗原は分子量 $45\text{kDa}$ のTNF (腫瘍細胞壊死因子, tumor necrosis factor) レセプターファミリーに属するI型膜タンパク質であり、Fasリガンドと結合することにより、細胞死を誘導する。Fas抗原の発現が各種血球系細胞や、肝臓、心臓、小腸など多くの組織や細胞で見られるのに対して、分子量 $40\text{kDa}$ のII型膜タンパク質であるFasリガンドの発現は活性化Tリンパ球やナチュラルキラー (NK) 細胞、マクロファージ、精巣、角膜などに限られる。最近、マウスにおける遺伝子の解析から、Fas抗原遺伝子は、lpr (lymphoproliferation) マウスと呼ばれる自己免疫疾患発症マウスにおいて変異が起きているlpr構造遺伝子そのものであること、またlprマウスと同様の症状を呈するgld (generalized-lymphoproliferative disease) マウスではFasリガンドに変異が起きていることが明らかにされた。ヒトにおいてもFas抗原遺伝子に変異を有する自己免疫疾患患者が報告されており、Fas/Fasリガンド系の機能不全が自己免疫疾患を惹起することが強く示唆されている (サイエンス (SCIENCE) 268, 1347-1349, 1995)。

・【0004】また、ヒトFasリガンドの大部分がマトリックスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase) により切断され、可溶性Fasリガンドとして遊離されることが判明し、Fasリガンドが細胞間の接触による相互作用だけでなく、より広範に免疫応答を調節している可能性も示唆されている (ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE) 182, 1777-1783, 1995)。Fasリガンド以外にも、多彩な生物活性を有するTNFファミリーに属するタンパク質の中で、TNF- $\alpha$ 、リンボトキシン- $\alpha$  (Lymphotoxin- $\alpha$ , LT- $\alpha$ ) およびリンボトキシン- $\beta$  (Lymphotoxin- $\beta$ , LT- $\beta$ ) にアポトーシスを誘導する活性があることが報告されている (ザ・ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン (THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE) 334, 1717-1725, 1996)。またごく最近、Fasリガンド様タン

3

バク質として、TL4がHuman Genome Science社から報告された(Immunity 8:21-30, 1998)。TL4は配列表(配列番号: 1)に示すように、アミノ酸240残基から構成されるタンパク質で、N末端に37残基のcytoplasmic tail、22残基のtransmembrane領域を含んでいる。C末端側のreceptor binding領域(150残基)は、FasL、TNF- $\alpha$ 、LT、CD40L、TRAILなどと各々、25-35%のホモロジーがあり、やはり可溶性リガンドとして遊離し薬理作用を示すと考えられる。また、TL4に対するレセプターは、TNFRファミリーのHVEM(herpes virus entry mediator)およびLT $\beta$ Rであり、soluble decoy receptorとしてTR6/DcR3が存在する。TL4の生理作用として最近、HVEMおよびLT $\beta$ Rを発現している癌細胞に対してアポトーシスをもたらしことが分かり、抗ガン剤としての可能性が注目されている(J. Clin. Invest. 102 1142-1151, 1998; WO 98/03648号)。また、TL4は活性化PB L細胞に対して、IFN $\gamma$ の発現分泌を促進することから免疫調節剤としての機能も有すると考えられる。さらにごく最近、TL4の正常ヒト肝実質細胞に対するDNA合成促進作用が見いだされたことから、肝臓機能調節剤としても有用である(特願2000-014044号)。

・[0005] 一般に生体内に微量にしか存在しない生理活性タンパク質の薬理薬効作用について検討を行う場合、組み換え型として多量発現させ純化するのが常套手段となっている。Fasリガンド様タンパク質であるTL4の場合においても、CHO細胞などを用いた動物細胞発現系やSf-9細胞などを用いた昆虫細胞発現系を利用して、活性型TL4の分泌発現が認められた。ただ、これらの真核細胞の培養は効率的でなく、しかも組み換え型タンパク質の発現量もそう高くはなく、生理活性タンパク質の工業的規模での製造法として問題も数多い。一方、大腸菌などの原核細胞を宿主として用いた場合、かなりの確率で組み換え型タンパク質の高発現が期待できる。この場合、多量に生産された組み換え型タンパク質は大腸菌内で封入体とよばれる不溶性の顆粒を形成し、変性した還元型として存在する。従って、封入体から組み換え型タンパク質を取得するためには、塩酸グアニジンなどのタンパク変性剤で変性抽出を行った後、リフォールディングとよばれる操作でポリペプチド鎖を巻き戻し、活性型のコンフォメーションを賦与する必要がある。事実、このような手法を駆使して、成長ホルモンやインターロイキン-2などが大腸菌から生産され、医薬品として製造販売されている。ただ、このリフォールディング操作は、個々のタンパク質の性質によって、難易度に幅がある。特に、システイン残基を多数含有する(従って、多数のジスルフィド結合を形成する)タンパク質の場合は、そう簡単ではないことはよく知られている。実際、特開平4-218387号や特開平9-121886号においては、目的蛋白抽出時に強還元剤であ

4

るDTTを用いているが、リフォールディング操作前に透析、ゲルろ過等により、還元剤を除去する必要がある。また、Journal of Endocrinology(1997) 153, 139-150では、目的蛋白抽出時にシステインを添加しているが、該方法が生理活性タンパク質の工業的規模での製造法として適するか否かは不明である。

・[0006]

・[発明が解決しようとする課題] Fasリガンド様タンパク質であるTL4の場合、システインは2残基で一对のジスルフィド結合を形成するだけであるが、大腸菌で組み換え型として発現させた場合、これら通常のリフォールディング条件では、活性型のコンフォメーションを有するTL4を効率よく取得することは不可能であった。

・[0007]

・[課題を解決するための手段] 本発明者らは、これらの欠点を解決すべく、原核細胞の高生産性を利用すると共に、効率的な活性化方法(再生方法)を提供すべく鋭意研究を重ねた。その結果、遺伝子組み換え型タンパク質を原核細胞において発現後、活性化する方法において、抽出時の低濃度での還元剤添加とリフォールディング時のアミノ酸添加を組み合わせることにより、予想外にも飛躍的に組み換え型タンパク質の収量が上昇することをFasリガンド様タンパク質であるTL4を具体例として見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させたタンパク質に対して、抽出時の低濃度での還元剤添加およびリフォールディング時のアミノ酸添加、を施すことを特徴とする組み換え型タンパク質またはその塩の効率的な製造方法に関するものである。具体的には、本発明は、

・(1) 遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させたタンパク質を、還元電位が-331mVより大きい還元剤を約0.1mM~約50mMの濃度で含有する溶液を用いて抽出し、メルカプト基を有さないアミノ酸またはその塩を含有する溶液中でリフォールディングすることを特徴とする活性型タンパク質またはその塩の製造方法、

・(2) ①メルカプト基を有さないアミノ酸またはその塩および②還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオン、システインおよびシスチン、またはシステアミンおよびシスタミンを含有する溶液中でリフォールディングすることを特徴とする上記(1)記載の製造方法、

・(3) タンパク質がFasリガンド様タンパク質である上記(1)記載の製造方法、(4) Fasリガンド様タンパク質がTL4である上記(3)記載の製造方法、

・(5) 還元剤がメルカプト基を有する化合物である上記(1)記載の製造方法、(6)メルカプト基を有する化合物が2-メルカプトエタノールまたはシステアミンである上記(5)記載の製造方法、(7)メルカプト基を有さないアミノ酸がアルギニンである上記(1)記載の製造方法、および(8)タンパク質を遺伝子工学的に原

5

核細胞宿主中で発現させ、還元電位が $-331\text{ mV}$ より大きい還元剤を約 $0.1\text{ mM}$ ～約 $50\text{ mM}$ の濃度で含有し、かつタンパク変性剤を含む溶液を用いて該タンパク質を該細胞から抽出・可溶化し、ついでメルカプト基を有さないアミノ酸またはその塩を含有するリフォルディング溶液で変性剤を不作用濃度まで希釈することの特徴とする上記(1)記載の製造方法などを提供するものである。

〔0008〕本発明の実施例で用いられるFasリガンド様タンパク質は、公知のFasリガンドやTNF $\alpha$ などと同様の作用を有するものであって、哺乳動物由来のFasリガンド様タンパク質や、そのN末端にMetが付加されたタンパク質等があげられ、中でも配列番号：1または配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチド、特に配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第84(Ile)～第240(Val)番目の部分アミノ酸配列または配列番号：4で表されるアミノ酸配列のN末端から第81(Leu)～第239(Val)番目の部分アミノ酸配列を含有する可溶性ヒトTL4または可溶性マウスTL4およびそれらのN末端にMetが付加されたタンパク質が好ましい。さらには、配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第84(Ile)～第240(Val)番目の部分アミノ酸配列または配列番号：4で表されるアミノ酸配列のN末端から第81(Leu)～第239(Val)番目の部分アミノ酸配列を含有する可溶性ヒトTL4または可溶性マウスTL4と同様の作用を有する限り、そのN末端もしくはC末端の欠損型ムテインや逆にN末端もしくはC末端が伸展したムテイン、配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第84(Ile)～第240(Val)番目の部分アミノ酸配列または配列番号：4で表されるアミノ酸配列のN末端から第81(Leu)～第239(Val)番目の部分アミノ酸配列中の特定のアミノ酸残基を置換したムテイン等があげられる。また、本明細書において、Fasリガンド様タンパク質とは、W098/03648号、W097/34911号、US Patent No. 5,874,240号などに記載のタンパク質をも包含する意味で用いられる。本明細書においてタンパク質の塩としては、塩酸、臭化水素、硝酸、硫酸、リン酸等の無機酸との塩、酢酸、フタル酸、フマル酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、メタシスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機酸との塩、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩等の薬学的に許容されうる塩や水和物等があげられる。

〔0009〕本発明で用いられる原核細胞としては、Escherichia coli(大腸菌)等のエシェリヒア属菌、Bacillus subtilis(枯草菌)等のバチルス属菌、Serratia marcescens(セラチア)等のセラチア属菌等があげられ、中でもEscherichia coli等が好ましい。これらの原

(4)

6

核細胞の形質転換、培養等は次に示す方法のほか、常法(例えば、特開平3-204897号公報に記載の方法等)に準じて行うこともできる。例えば、本発明の実施例で用いられるFasリガンド様タンパク質をコードするcDNAを含有する発現型ベクターは、例えば、(i) Fasリガンド様タンパク質産生細胞からメッセンジャーRNA(mRNA)を分離し、(ii) 該mRNAから単鎖のcDNAを、次いで二重鎖DNAを合成し、(iii) 該相補DNAをファージまたはプラスミドに組み込み、(iv) 得られた組み換えファージまたはプラスミドで宿主を形質転換し、(v) 得られた形質転換体を培養後、形質転換体から適当な方法、例えばFasリガンド様タンパク質の一部をコードするDNAプローブとのハイブリダイゼーションにより、あるいは抗体を用いたイムノアッセイ法により目的とするDNAを含有するファージあるいはプラスミドを単離し、(vi) その組み換えDNAから目的とするクローン化DNAを切り出し、(vii) 該クローン化DNAまたはその一部を発現ベクター中のプロモーターの下流に連結する、ことにより製造することができる。

〔0010〕cDNAを組み込むプラスミドとしては、たとえば大腸菌由来のpBR322〔ジーン(Gene)、2巻、95頁(1977年)〕、pBR325〔ジーン、4巻、121頁(1978年)〕、pUC12〔ジーン、19巻、259頁(1982年)〕、pUC13〔ジーン、19巻、259頁(1982年)〕、枯草菌由来のpUB110〔バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochemical and Biophysical Research Communications)、112巻、678頁(1983年)〕などがあげられるが、その他のものであっても、宿主内で複製増殖されるものであれば、いずれを用いることもできる。またcDNAを組み込むファージベクターとしては、たとえば $\lambda$ gt11〔ヤング及びデーヴィス(Young, R. and Davis, R.)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユー・エス・エー(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.)、80巻、1194頁(1983年)〕などがあげられるが、その他のものであっても宿主内で増殖できるものであれば用いることができる。プラスミドに組み込む方法としては、たとえば、ティー・マニアティス(T. Maniatis)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)、239頁(1982年)に記載の方法などがあげられる。またファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、たとえばヒュン・(Hyunh, T. V.)らの方法〔ディー・エヌ・エー・クローニング・ア・プラクティカル・アプローチ(DNA Cloning, A Practical Approach) 1巻、49頁(1985年)〕などがあげられる。

(5)

7

・【0011】このようにして得られたプラスミドは、適当な宿主たとえばエシェリヒア (*Escherichia*) 属菌、バチルス (*Bacillus*) 属菌などに導入する。上記エシェリヒア属菌の例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12DH1 [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 60巻、160頁 (1968年)]、JM103 [ヌクレイック・アシックス・リサーチ (Nucleic Acids Research)、9巻、309頁 (1981年)]、JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)、120巻、517頁 (1978年)]、HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー、41巻、459頁 (1969年)]、C600 [ジェネティクス (Genetics)、39巻、440頁 (1954年)]、MM294 [ネイチャー (Nature)、217巻、1110頁 (1968年)]などがあげられる。上記バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチリス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン、24巻、255頁 (1983年)]、207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry) 95巻、87頁 (1984年)]などがあげられる。プラスミドで宿主を形質転換する方法としては、たとえばティー・マニアティス (T. Maniatis) ら、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、249頁 (1982年) に記載のカルシウムクロライド法あるいはカルシウムクロライド/ルビジウムクロライド法などがあげられる。またファージ・ベクターを用いる場合には、たとえば増殖させた大腸菌にインビトロパッケージング法を用いて導入することができる。

・【0012】このようにしてクローン化されたFasリガンド様タンパク質をコードするcDNAは必要があればプラスミド、例えばpBR322、pUC12、pUC13、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119などにサブクローニングすることができる。このようにして得られたcDNAの塩基配列を、たとえばマキサム・ギルバート (Maxam-Gilbert) 法 (Maxam, A. M. and Gilbert, W., プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユー・エス・エー (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.)、74巻、560頁 (1977年)) あるいはジデオキシ法 (Messing, J. ら、ヌクレイック・アシックス・リサーチ (Nucleic Acids Research) 9巻、309頁 (1981年)) によって決定し、既知のアミノ酸配列との比較からFasリガンド様タンパク質のcDNAの存在を確認できる。上記のようにして、本発明の実施例で用いられるFasリガンド様タンパク質をコードするcDNAが得られる。上記のようにしてクローン化され

8

たFasリガンド様タンパク質をコードするcDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素やエキソヌクレアーゼで消化して使用することが出来る。

・【0013】次に、クローン化されたcDNAから発現させたい領域を切り出し、発現に適したベクター (ベクター) 中のプロモーターの下流に連結して発現型ベクターを得ることができる。該cDNAはその5'末端に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。さらに該DNAを発現させるにはその上流にプロモーターを接続する。ベクターとしては、上記の大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来プラスミド (例、pUB110、pTP5、pC194) などがあげられる。

・【0014】本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。形質転換する際の宿主がエシェリキア属菌である場合は、T7プロモーター、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。とりわけ宿主がエシェリキア属菌でプロモーターがT7プロモーター、trpプロモーターまたはλPLプロモーターであることが好ましい。なお、発現にエンハンサーの利用も効果的である。このようにして構築されたFasリガンド様タンパク質をコードするcDNAを含有するベクターを用いて、原核細胞の形質転換体を製造する。

・【0015】上記エシェリキア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、69巻、2110頁 (1972年) やジーン (Gene)、17巻、107頁 (1982年) などに記載の方法に従って行なわれる。バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics)、168巻、111頁 (1979年) などに記載の方法に従って行なわれる。このようにして、Fasリガンド様タンパク質をコードするcDNAを含有する発現ベクターで形質転換された原核細胞の形質転換体が得られる。宿主としてエシェリヒア属菌を、プロモーターとしてT7プロモーターを用いる場合、T7プロモーターの発現効率の向上を目的として、Fasリガンド様タンパク質をコードするcDNAを含有する発現ベクターに加え、T7リゾチーム発現プラスミドを共存させてもよい。

・【0016】宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌で

9

ある形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller)、ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics)、431~433頁、Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕、LB培地等が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえばイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラ

ノシド (IPTG)、3 $\beta$ -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

・〔0017〕組み換え型タンパク質が宿主原核細胞中で封入体を形成する場合には、培養後、遠心分離等の方法により集菌した後、細胞を破碎し、封入体を変性剤を用いて可溶化することによって、組み換え型タンパク質を抽出することができる。細胞の破碎は、常法で、たとえば超音波処理により実施できる。懸濁媒体として中性付近のpH値 (pH6.5~7.5) に調整した好適な緩衝液 (例えばリン酸緩衝液等) を用いることが好ましい。この際、細胞の破碎を促進させるためEDTAを添加してもよい。このようにして細胞を破碎した後に、不溶成分 (封入体) を任意の方法で、遠心分離するか、濾過することにより分取する。原核細胞由来の蛋白質をできる限り除去するため、たとえば水、リン酸緩衝液を用いて洗浄することが好ましいが、場合により4M程度の尿素で洗浄してもよい。得られた沈殿 (ペレット) を変性剤を用いて可溶化する際の変性剤としては、公知の変性剤、特にグアニジンまたは尿素等を使用することができる。変性剤は通常水溶液として用いられ、水溶液中の変性剤の濃度は、グアニジンでは1~8モル/リットル、好ましくは約3~6モル/リットル、尿素では5~9モル/リットル、好ましくは約8モル/リットルである。グアニジンは通常グアニジン塩酸塩等のグアニジンの酸付加塩として用いられる。

(6)

10

・〔0018〕組み換え型タンパク質が宿主原核細胞中で封入体を形成しない場合には、培養後、遠心分離等の方法により集菌した後、細胞を変性剤を用いて可溶化するか、あるいは細胞を破碎後変性剤で可溶化することによって組み換え型タンパク質を抽出することができる。集菌した細胞の可溶化に用いられる変性剤としては、例えばグアニジンなどがあげられる。変性剤は通常水溶液として用いられ、水溶液中の変性剤の濃度は、グアニジンでは通常1~8モル/リットル、好ましくは約3~6モル/リットルである。グアニジンは通常グアニジン塩酸塩等のグアニジンの酸付加塩として用いられる。細胞の破碎は、常法で、たとえば超音波処理、フレンチ・プレスにより実施できる。破碎された細胞の可溶化に用いられる変性剤としては、公知の変性剤、特にグアニジンまたは尿素を使用することができる。変性剤は通常水溶液として用いられ、水溶液中の変性剤の濃度は、グアニジンでは1~8モル/リットル、好ましくは約3~6モル/リットル、尿素では5~9モル/リットル、好ましくは約8モル/リットルである。グアニジンは通常グアニジン塩酸塩等のグアニジンの酸付加塩として用いられる。また、菌体内で発現させた組み換え型タンパク質がシステイン残基を含有する場合、封入体を形成するしないに拘わらず、変性剤を用いた抽出操作のさいに還元剤を添加することは、一般的によく行われている (Biotechnology and Bioengineering 41: 3-13, 1993)。これは、菌体内もしくは抽出操作以前に形成された組み換え型タンパク質のS-S結合 (多くは天然型には存在しない間違った分子間や分子内S-S架橋様式) を切断する目的で、DTTなどの還元力の強い試薬を高濃度 (少なくとも10mM以上) 添加するのが通常である。従って、抽出後のS-S結合形成を伴うリフォールディング操作を行う場合には、それに先だって透析やゲル濾過により還元剤を除去する必要がある。

・〔0019〕これに対して、本発明の製造方法は、変性剤を用いた抽出操作中のS-S結合形成を妨げる目的で、低濃度 (約0.1mM~約50mM、好ましくは約0.1mM~約10mM) の弱い (還元電位が-331mVより大きい) 還元剤 (たとえば、2-メルカプトエタノールまたはシステアミン等) を抽出操作時の酸化防止剤として使用する。本発明の製造方法では、低濃度の弱い還元剤を用いているので、従来技術のようにリフォールディング前の還元剤除去操作を必要としない。組み換え型タンパク質抽出に際して、変性剤を含む抽出溶液に添加される還元剤としては、本発明の目的が達成される限り、いずれの還元剤でもよく、2-メルカプトエタノールの他にグルタチオン、システイン、システアミンなどがあげられる。組み換え型タンパク質の収率の点で好ましい還元剤の添加濃度は0.1~50ミリモル/リットル、特に好ましくは1~10ミリモル/リットルである。

(7)

11

・【0020】上記のようにして封入体の可溶化を行うか、あるいは菌体を変性剤で直接可溶化するか、あるいは細胞を破砕後変性剤で可溶化した後、遠心分離等で不純物を除去し、得られた上澄液に対して、組み換え型タンパク質のリフォールディング（活性化、再生化）を行うことができる。リフォールディングは、組み換え型タンパク質を含有する上澄液を緩衝液で約10～25倍に希釈することにより行われる。この場合、変性剤の濃度を活性化に適した中性pHにおいて不作用濃度まで希釈することが望ましく、たとえば変性剤がグアニジンである場合には希釈液中のグアニジンの濃度を0～2.0モル/リットル、好ましくは約1モル/リットル以下まで、変性剤が尿素である場合には希釈液中の尿素の濃度を0～4.0モル/リットル、好ましくは約2モル/リットル以下まで希釈することが望ましい。

・【0021】本発明の製造方法において、リフォールディング時に用いる希釈緩衝液には、チオール基（メルカプト基）を有さないアミノ酸（たとえば、アルギニン等）を含有させる。後述の実施例5からも明らかとなり、チオール基を有さないアミノ酸（たとえば、アルギニン等）の添加は前述の抽出時の低濃度での還元剤添加と組み合わせると、予想外にも組換え型タンパク質またはその塩の飛躍的な収量上昇をもたらす。さらに、リフォールディング時の希釈緩衝液には、レドックスバッファー（酸化型グルタチオン(GSSG)および還元型グルタチオン(GSH)、システインおよびシスチン、またはシステアミンおよびシスタミンなど）を加えてもよい。レドックスバッファー中の酸化剤および還元剤の濃度は一般にそれぞれ0.01～100ミリモル/リットル、特に好ましくは0.1～10ミリモル/リットルである。リフォールディングに際して希釈緩衝液に添加されるチオール基を有さないアミノ酸としては、本発明の目的が達成される限り、チオール基を有さないアミノ酸であればいずれのアミノ酸でもよいが、アルギニンの他にアスパラギン酸、バリン、リジン、アラニン、シトルリン等があげられる。組み換え型タンパク質のリフォールディングにおける収率の点で好ましいアミノ酸添加濃度は、0.1～2.0モル/リットル、特に好ましくは0.1～1.0モル/リットルである。

・【0022】なお、可溶化後かつリフォールディングの前に、例えば抽出、塩析、透析、分配、結晶化、再結晶、ゲルろ過、クロマトグラフィー等の公知で常用の精製工程を導入することができ、好ましくは、たとえば0.1モル/リットルリン酸緩衝液中セファデックス（Sephadex）G-25（ファルマシアバイオテク（株））にかけることにより精製することができる。変性剤の分離は場合により0.1モル/リットルリン酸緩衝液に対して透析することによっても可能である。精製工程はリフォールディングに続いて行うこともできる。一般にそのような精製としては例えば抽出、塩

12

析、透析、分配、結晶化、再結晶、ゲルろ過、クロマトグラフィー等があげられ、好ましい例として透析や、たとえばSP-Sephacrose FF（ファルマシア・バイオテク（株））、CM-5PW（トーソー（株））あるいは、DEAE-5PW（トーソー（株））を介したイオン交換クロマトグラフィー、たとえばODP-50（昭和電工（株））を用いた逆相クロマトグラフィー等による精製法があげられる。

・【0023】本発明で得られる組み換え型タンパク質は、公知の天然型タンパク質と同様の作用を有しており、公知の天然型タンパク質の使用方法和同様にして用いることができる。

・【0024】

・【発明の実施の形態】本発明明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。また、アミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: 伝令リボ核酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
2-ME	: 2-メルカプトエタノール
DTT	: ジチオスレイトール
Gly (G)	: グリシン
Ala (A)	: アラニン
Val (V)	: バリン
Leu (L)	: ロイシン
Ile (I)	: イソロイシン
Ser (S)	: セリン
Thr (T)	: スレオニン
Cys (C)	: システイン
Met (M)	: メチオニン
Glu (E)	: グルタミン酸
Asp (D)	: アスパラギン酸
Lys (K)	: リジン
Arg (R)	: アルギニン
His (H)	: ヒスチジン
Phe (F)	: フェニルアラニン
Tyr (Y)	: チロシン
Trp (W)	: トリプトファン
Pro (P)	: プロリン
Asn (N)	: アスパラギン

50

(8)

13

Gln (Q) : グルタミン

Asx : Asp+Asn

Glx : Glu+Gln

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

・〔配列番号：1〕 ヒトTL4をコードするアミノ酸配列を示す。

・〔配列番号：2〕 後述の参考例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

・〔配列番号：3〕 後述の参考例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

・〔配列番号：4〕 マウスTL4をコードするアミノ酸配列を示す。

・〔配列番号：5〕 後述の参考例3で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

・〔配列番号：6〕 後述の参考例3で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

以下の参考例および実施例によって本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに制限されるものではない。

・〔0025〕

・〔参考例〕 参考例1 大腸菌での可溶型ヒトTL4発現用プラスミドの構築

ヒトTL4 (配列番号：1) の細胞外領域に対応する第84アミノ酸残基 (Ile) から第240アミノ酸残基 (Val) までをコードするDNA断片を得るため、鋳型として特開平11-141106号公報の参考例1に記載のプラスミドpTB1939、プライマーとして2個のオリゴヌクレオチド (配列番号：25' -TATACATATGATACAAGAGCGAAGGTC-3'、配列番号：35' -AGCCGGATCCGACCTCACACCATGAAA-3') を用いてPCR (polymerase chain reaction) を行った。得られたPCR産物の塩基配列をTAクローニングし、塩基配列を確認した後、NdeIおよびBamHIで消化し、2.0%アガロースゲル電気泳動で分画して、目的とするDNA断片を単離した。このNdeI-BamHI断片を、同じくNdeIおよびBamHIで消化したpTCIIのT7プロモーターの下流にT4DNAリガーゼを用いて連結しプラスミドpTCII-shTL4 (図2) を得た。

・〔0026〕 参考例2 大腸菌での可溶型ヒトTL4の発現

T7 RNAポリメラーゼ遺伝子 (lacプロモーター制御下) を有する大腸菌MM294 (DE3) に、上記参考例1で得られたプラスミドpTCII-shTL4を導入し、大腸菌MM294 (DE3)/pTCII-shTL4を得た。この形質転換細胞を、10μg/mlのテトラサイクリンを含むLB培地 (1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム) 1リットルを仕込んだ2リットル容フラスコ中で37℃、8時間振とう培養

14

した。得られた培養液を5μg/mlのテトラサイクリンを含む主発酵培地 (1.68%リン酸一水素ナトリウム、0.3%リン酸二水素カリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.02%消泡剤、0.00025%硫酸第一鉄、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、1.5%カザミノ酸) 19リットルを仕込んだ50リットル容発酵槽へ移植して、37℃で通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約500クレット単位になった時点で、75μM分のイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加し、さらに2時間培養を続けた (1480クレットユニット)。最終的にこの培養液の遠心分離を行うことにより、約210gの湿菌体が得られ、-80℃に凍結保存された。なお本菌体における可溶型ヒトTL4の発現量は、菌体抽出液をSDS-PAGEに供し、可溶型ヒトTL4が示す17Kdのバンドの染色度から、約4mg/g湿菌体 (50mg/L) と推測された。

・〔0027〕 この形質転換大腸菌MM294 (DE3)/pTCII-shTL4は、2000年2月2日から茨城県つくば市東1-1-3、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERM B P-7019として、また受託番号IFO 16356として2000年1月20日付で大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85、財団法人発酵研究所 (IFO) に寄託されている。また、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するヒトTL4をコードするDNAは、形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) DH10B/pTB1939およびエシェリヒア コリ (Escherichia coli) DH10B/pTB1940として、それぞれ1996年7月17日から茨城県つくば市東1-1-3、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERM BP-5595およびFERM BP-5596として、また1996年7月11日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85、財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 15997およびIFO 15998として寄託されている。

・〔0028〕 参考例3 大腸菌での可溶型マウスTL4発現用プラスミドの構築

マウスTL4をコードするアミノ酸配列 (配列番号：4) の細胞外領域に対応する81アミノ酸残基 (Leu) から239アミノ酸残基 (Val) (図7) までをコードするDNA断片を得るため、鋳型としてW098/03648号の参考例2に記載のプラスミドpTB1958、プライマーとして2個のオリゴヌクレオチド (配列番号：5；5'-GGCATATGCTGATACAAGATCAACGATCTC-3'、配列番号：6；5'-CGGATCCTCA GACCATGAAAGCTCCGA AAT-3') を用いてPCR (polymerase chain rea



15

ction)を行った。得られたPCR産物の塩基配列をT  
Aクローニングし、塩基配列を確認した後、Nde Iお  
よびBamHIで消化し、2.0%アガロースゲル電気  
泳動で分画して、目的とするDNA断片を単離した。こ  
のNde I-BamHI断片を、同じくNde Iおよび  
BamHIで消化したpTCIIのT7プロモーターの下  
流にT4 DNAリガーゼを用いて連結しプラスミドpT  
CII mTL4 (図8)を得た。

・[0029] 参考例4 大腸菌での可溶型マウスTL4  
の発現

T7 RNAポリメラーゼ遺伝子(lacプロモーター制御  
下)を有する大腸菌MM294 (DE3)に、上記参考例  
3で得られたプラスミドpTCII mTL4を導入し、  
大腸菌MM294 (DE3)/pTCII mTL4を得た。  
この形質転換細胞を、10  $\mu$ g/mlのテトラサイクリ  
ンを含むLB培地(1%ペプトン、0.5%酵母エキ  
ス、0.5%塩化ナトリウム)1リットルを仕込んだ2  
リットル容フラスコ中で37℃、8時間振とう培養し  
た。得られた培養液を5  $\mu$ g/mlのテトラサイクリン  
を含む主発酵培地(1.68%リン酸一水素ナトリウ  
ム、0.3%リン酸二水素カリウム、0.1%塩化アン  
モニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.05%硫酸  
マグネシウム、0.02%消泡剤、0.00025%硫酸  
第一鉄、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ  
糖、1.5%カザミノ酸)19リットルを仕込んだ5  
0リットル容発酵槽へ移植して、37℃で通気攪拌培  
養を開始した。培養液の濁度が約500クレット単位に  
なった時点で、75  $\mu$ Mのイソプロピル- $\beta$ -D-チオ  
ガラクトピラノシド(IPTG)を添加し、さらに4時  
間培養を続けた(1905クレット)。最終的にこの培養液の  
遠心分離を行うことにより、約210gの湿菌体を得ら  
れ、-80℃に凍結保存された。なお本菌体における可  
溶型マウスTL4の発現量は、菌体抽出液をSDS-PAGEに  
供し、可溶型マウスTL4が示す17Kdのバンドの染  
色度から、約50mg/g湿菌体(550mg/L)と推測  
された。この形質転換大腸菌MM294 (DE3)/pT  
CII mTL4は、2001年3月5日から茨城県つくば  
市東1-1-3、経済産業省産業技術総合研究所生命工  
学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM B  
P-7481として、また受託番号IFO 16550  
として2001年2月1日付で大阪府大阪市淀川区十三  
本町2-17-85、財団法人発酵研究所(IFO)に  
寄託されている。

・[0030]

・[実施例] 実施例1 可溶型ヒトTL4の大腸菌からの  
抽出

参考例2で得られた菌体25gに、50mMトリス/H  
Cl、5mMEDTA (pH7.5)125mLを加え  
て超音波破砕機(ソニファー 450)(ブランソン  
・株)を用いて4℃、5分間の菌体破砕を繰り返した

(9)

16

後、遠心分離(15000rpm、30分間)を行い、  
沈殿画分(封入体画分)を得た。本沈殿画分を50mM  
トリス/HCl、5mMEDTA (pH7.5)500  
ml、50mMトリス/HCl、4M尿素(pH7.  
5)50ml、にて洗浄を行った後、沈殿画分に50m  
Mトリス/HCl、4Mグアニジン塩酸塩(pH7.  
5)、5mM 2-メルカプトエタノール 75mlを  
加えて4℃で一晩攪拌溶解した後、遠心分離(1500  
0rpm、30分間)を行い上澄液を得た。

10 ・[0031] 実施例2 可溶型ヒトTL4のリフォル  
ディング

実施例1で得られた上澄液に0.8Mアルギニン、50  
mMトリス/HCl (pH8.0)1.5リットルを加  
えて、4℃で一晩活性化を行った。

・[0032] 実施例3 可溶型ヒトTL4の精製

実施例2で得られた活性化の終了した再生液をpH6に  
調整し、限外濾過膜(再生セルロース膜 分画分子量3  
K(k dalton)、膜面積0.1m<sup>2</sup>・X 2枚)(ミリポ  
ア(株))で濃縮した後、蒸留水で4倍に希釈し、遠心  
分離(8000rpm、15分間)を行ない上澄液を得  
た。本上澄液を50mM酢酸緩衝液(pH6.0)15  
0mM NaClで平衡化したSP-Sepharos  
e FF(1.1cmID X 5cmL、5mL)(フ  
ァルマシア バイオテック(株))に吸着させた後、0~  
60%B(B=50mM酢酸緩衝液(pH6.0)、  
1.5M NaCl)の段階勾配で40分間、4ml/  
分の流速で溶出し、TL4を含むフラクションをプール  
した。続いて、50mM酢酸緩衝液(pH6.0)、1  
50mM NaClで平衡化したCM-5PW(21.  
5mmID X 150mmL、13 $\mu$ m)(東ソー  
・株)に吸着させた後、0~40%B(B=50mM  
酢酸緩衝液(pH6.0)、1.5M NaCl)の段  
階勾配で30分間、5ml/分の流速で溶出した。TL  
4のフラクションをプールし、TL4の沈殿防止の為、  
蒸留水で2倍に希釈した。本希釈液を限外濾過膜(アミ  
コン 8050YM-10)(ミリポア(株))で濃縮し  
た後50mM酢酸緩衝液(pH6.0)、150mM  
NaClに置換し、可溶型ヒトTL4約1.5mgを得  
た。

40 ・[0033] このようにして得られた可溶型ヒトTL4  
標品の純度を測定する目的で、SDSポリアクリルアミ  
ドゲル電気泳動を行った。本標品を100mM DTT  
を添加したSample buffer [Laemmli, Na  
ture, 227, 680 (1979)]に懸濁し、95℃で1分間加熱  
した後、マルチゲル15/25(第一化学薬品)で電気  
泳動を行った。泳動後のゲルをクーマシー・ブリリアン  
ト・ブルー(Coomassie brilliant blue)で染色した結  
果、約17Kdに単一バンドの蛋白が認められた。この  
ことから可溶型ヒトTL4の本標品は単一であり、きわ  
50 めて高純度の標品であることが分かった(図3)。

(10)

17

・【0034】実施例4 HPLCを用いた可溶性ヒトTL4の分析

実施例3で得られた可溶性ヒトTL4の純度を測定する目的でギルソンHPLCシステム（ギルソン（株））を用いイオン交換、逆相HPLCにより分析を行った。イオン交換HPLCにおいては50mM酢酸緩衝液（pH 5.8）、150mM NaClで平衡化したCM-5 PW（7.5mmID X 75mmL、10 $\mu$ m）（東ソー（株））に可溶性ヒトTL4 5 $\mu$ gを注入し、0～30%B（B=50mM酢酸緩衝液（pH 5.8）、1.5M NaCl）の段階勾配で30分間、0.8ml/分の流速で溶出した。逆相HPLCにおいては30%B（A=0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）、B=80% アセトニトリル/0.1%TFA）で平衡化したC4P-50（4.6mmID X 250mmL、5 $\mu$ m）（昭和電工（株））に可溶性ヒトTL4 2 $\mu$ gを注入し、30～60%Bの段階勾配で40分間、0.5ml/分の流速で溶出した。検出は280ナノメートルの波長で行い、得られたデータはクロマトコーダー21（システムインスツルメンツ（株））で波形処理を行い純度を計算した。その結果、可溶性TL4は単一ピークを示し、このことから可溶性ヒトTL4の本標品は単一であり、きわめて高純度の標品であることが分かった（図4）。

・【0035】実施例5 可溶性ヒトTL4収量に及ぼす効果：抽出時の還元剤添加効果およびリフォールディング時のアミノ酸添加効果

参考例2で得られた菌体10gに、50mMトリス/HCl（pH 7.5）50mlを加えて超音波破砕機（ソニファー450）（ブランソン（株））にて4℃、5分間の菌体破砕を4回繰り返した後、遠心分離（15000rpm、30分間）を行い、沈殿画分（封入体画分）を得た。本沈殿画分を50mMトリス/HCl、5mM EDTA（pH 7.5）10ml、50mMトリス/HCl、3M尿素（pH 7.5）10ml、にて洗浄を行った後、菌体5gより得られる沈殿画分に50mMトリス/HCl、4Mグアニジン塩酸塩（pH 7.5）

・【表1】

・ アミノ酸	1モル当たりの 残基数	可溶性ヒトTL4の塩基配列 から予測される値
・ Asx	5.9	6
・ Thr <sup>1)</sup>	8.7	9
・ Ser <sup>1)</sup>	13.8	15
・ Glx	14.1	14
・ Pro	6.5	6
・ Gly	18.6	19
・ Ala	9.7	10
・ Cys <sup>2)</sup>	N. D.	2

18

\*5)、0もしくは5mM 2-メルカプトエタノール15mlを加えて4℃で一晩攪拌溶解した後、遠心分離（15000rpm、30分間）を行い上澄液を得た。本上澄液1mlに50mMトリス/HCl、0.02、0.4、0.6もしくは0.8Mアルギニン（pH 8.0）のリフォールディング液20mlを加えて、4℃で一晩活性化を行なった後、酢酸でpH6に調整し、蒸留水にて4倍に希釈して遠心分離（3000rpm、15分間）を行い上澄液を得た。本上澄液を50mM酢酸緩衝液（pH 6.0）150mM NaClで平衡化したSP-Sepharose FF（8mmID X 50mmL）（ファルマシア バイオテック（株））に吸着させた後、0～100%B（B=50mM酢酸緩衝液（pH 6.0）、1.5M NaCl）の段階勾配で20分間、1ml/分の流速で溶出した。得られたTL4フラクションをプールした後、実施例4で示したC4P-50（4.6mmID X 250mmL、5 $\mu$ m）（昭和電工（株））を用いて可溶性ヒトTL4量を定量した。

・【0036】その結果、可溶性ヒトTL4収量はリフォールディング時のアルギニン添加により、著しく上昇することが分かった（図5）。さらに、このアルギニン添加と抽出時の2-メルカプトエタノール添加を組み合わせることにより、両者が相乗的に作用して可溶性ヒトTL4収量の飛躍的な増大をもたらすことも分かった（図5）。なお、可溶性ヒトTL4収量に対する抽出時の2-メルカプトエタノール至適濃度は5mM、リフォールディング時のアルギニン至適濃度は0.8Mであった。

・【0037】実施例6 可溶性ヒトTL4の蛋白化学的分析

・(a) アミノ酸組成分析

実施例3で得られた可溶性ヒトTL4について、そのアミノ酸組成値をアミノ酸分析計（ベックマンシステム6300E）を用いて決定した。その結果、本標品の測定値は、N末端にMetが付加された可溶性ヒトTL4のアミノ酸組成の理論値と一致した（表1）。

(11)

19		20
・ Val	12.7	15
・ Met	1.9	1
・ Ile	2.7	3
・ Leu	21	21
・ Tyr	7.9	8
・ Phe	3.8	4
・ His	5.0	5
・ Lys	12.0	12
・ Arg	7.1	7
・ Trp	2.6	3

酸加水分解 (6N HCl-4%チオグリコール酸、110℃、24及び48時間加水分解の平均値)

1) 0時間に外挿した値

2) 未検出

約10μgを用いて分析を行った。

・[0038] (b) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー (アブライドバイオシステムモデル492) を用いて決定し

た。その結果、得られた可溶性ヒトTL4のN末端には \* 20

\* Met が付加されていることの他は塩基配列から推定された可溶性ヒトTL4のN末端アミノ酸配列と一致した (表2)。

・[表2]

・ 残基No.	検出された PTH <sup>1)</sup> -アミノ酸 (pmol)	可溶性ヒトTL4の塩基配列から予測されるアミノ酸
・ 1	Met (14)	
・ 2	Ile (18)	Ile
・ 3	Gln (9.8)	Gln
・ 4	Glu (8.3)	Glu
・ 5	Arg (7.1)	Arg
・ 6	Arg (9.9)	Arg
・ 7	Ser (3.6)	Ser
・ 8	His (3.6)	His
・ 9	Glu (3.6)	Glu
・ 10	Val (3.8)	Val

1) フェニールチオヒダントイン

50 pmol を用いて分析を行った。

・[0039] (c) C末端アミノ酸分析

C末端アミノ酸をアミノ酸分析計 (ベックマンシステム6300E) を用いて決定した。得られた可溶性ヒトTL4は塩基配列から推定されたC末端アミノ酸と一致した (表3)。

・[表3]

C末端アミノ酸	回収率 (%)
Val	33.6

40 気相ヒドラジン分解法 (100℃、3.5時間)

4 nmol を用いて分析を行った。

・[0040] 実施例7 可溶性ヒトTL4の活性測定

実施例3で得られた精製可溶性ヒトTL4の有する癌細胞株に対する細胞障害活性を調べた。細胞障害活性は下記のようにして測定した。すなわち、96穴プレートにヒト大腸癌細胞株WiDrを5000個/wellで播種し、大腸菌由来可溶性ヒトTL4または特開平11-141106号公報の実施例1に記載の昆虫細胞由来可溶性ヒトTL4を種々の濃度で、インターフェロンγ (Genzyme社) を最終濃度200U/ml存在下、および非存在

50 nzyme社) を最終濃度200U/ml存在下、および非存在

(12)

21

下で作用させた。3日間培養後、プロモデオキシウリジンの取り込みをCell proliferation ELISA (ベリンガー社) で測定した。その結果、インターフェロン $\gamma$ 存在下において、大腸菌由来可溶型ヒトTL4は良好な細胞障害活性を示し、その効果は昆虫細胞由来可溶型ヒトTL4と同等であった(図6)。

・[0041] 実施例8 可溶型マウスTL4の大腸菌からの抽出

参考例4で得られた菌体30gに、50mMトリス/HCl、5mMEDTA (pH7.5) 150mLを加えて超音波破砕機(ソニファー450)(ブランソン・(株))を用いて4℃、5分間の菌体破砕を繰り返した後、遠心分離(15000rpm、30分間)を行い、沈殿画分(封入体画分)を得た。本沈殿画分を50mMトリス/HCl、5mMEDTA (pH7.5) 90mL、50mMトリス/HCl、4M尿素(pH7.5) 90mL、にて洗浄を行った後、沈殿画分に100mMトリス/HCl、4Mグアニジン塩酸塩(pH7.5)、5mM システアミン 900mLを加えて4℃で一晩攪拌溶解した後、遠心分離(8000rpm、30分間)を行い上澄液を得た。

・[0042] 実施例9 可溶型マウスTL4のリフォーリング

実施例8で得られた上澄液に0.8Mアルギニン、50mMトリス/HCl (pH8.0) 22.5リットルを加えて、4℃で一晩活性化を行った。

・[0043] 実施例10 可溶型マウスTL4の精製  
実施例9で得られた活性化の終了した再生液を限外濾過膜(再生セルロース膜分画分子量10K、膜面積0.1m<sup>2</sup>・X2枚)(ザルトリウス(株))で濃縮した後、pH6に調整し、蒸留水で4倍に希釈し、遠心分離(8000rpm、15分間)を行ない上澄液を得た。本上澄液を50mM酢酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したSP-Sepharose FF(5cmID X 5cmL、100mL)(ファルマシア バイオテック・(株))に吸着させた後、50mM酢酸緩衝液(pH6.0)、0.75M NaClにてTL4を溶出した。次に、50mM酢酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したSP-Sepharose HP(1.6cmID X 15cmL、25 $\mu$ )(ファルマシア バイオテック・(株))に吸着させた後、0~70%B(B=50mM酢酸緩衝液(pH6.0)、1.5M NaCl)の段階勾配で30分間、4mL/分の流速で溶出した。続いて、50mM酢酸緩衝液(pH6.0)、150mM NaClで平衡化したCM-5PW(21.5cmID X 150mmL、13 $\mu$ )(東ソー(株))に吸着させた後、0~60%B(B=50mM酢酸緩衝液(pH6.0)、1.5M NaCl)の段階勾配で40分間、5mL/分の流速で溶出した。TL4のフラクションをブールし、TL4の沈殿防止の為、蒸留水で2倍に希釈

22

した。本希釈液を限外濾過膜(ビバスピ20 分画分子量10K)(ザルトリウス(株))で濃縮した後50mM酢酸緩衝液(pH6.0)、150mM NaClに置換し、可溶型マウスTL4約1.2mgを得た。このようにして得られた可溶型マウスTL4標品の純度を測定する目的で、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。本標品を100mM DTTを添加したSample buffer [Laemmli, Nature, 227, 680 (1979)]に懸濁し、95℃で1分間加熱した後、マルチゲル15/25(第一化学薬品)で電気泳動を行った。泳動後のゲルをクーマシー・ブリリアント・ブルー(Co massie brilliant blue)で染色した結果、約17Kdに単一バンドの蛋白が認められた。このことから可溶型マウスTL4の本標品は単一であり、きわめて高純度の標品であることが分かった(図9)。

・[0044] 実施例11 HPLCを用いた可溶型マウスTL4の分析

実施例10で得られた可溶型マウスTL4の純度を測定する目的でギルソンHPLCシステム(ギルソン・(株))を用いイオン交換、逆相HPLCにより分析を行った。イオン交換HPLCにおいては50mM酢酸緩衝液(pH5.8)、150mM NaClで平衡化したCM-5PW(7.5mmID X 75mmL、10 $\mu$ )(東ソー(株))に可溶型マウスTL4 10 $\mu$ gを注入し、20~70%B(B=50mM酢酸緩衝液(pH5.8)、1.5M NaCl)の段階勾配で30分間、0.8mL/分の流速で溶出した。逆相HPLCにおいては30%B(A=0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)、B=80% アセトニトリル/0.1% TFA)で平衡化したC4P-50(4.6mmID X 250mmL、5 $\mu$ )(昭和電工(株))に可溶型マウスTL4 2.5 $\mu$ gを注入し、30~60%Bの段階勾配で40分間、0.5mL/分の流速で溶出した。検出は280ナノメートルの波長で行い、得られたデータはクロマトコーダー21(システム インストルメンツ・(株))で波形処理を行い純度を計算した。その結果、可溶型TL4は単一ピークを示し、このことから可溶型マウスTL4の本標品は単一であり、きわめて高純度の標品であることが分かった(図10)。

・[0045] 実施例12 可溶型マウスTL4収量に及ぼす効果---抽出時の還元剤添加効果およびリフォーリング時のアミノ酸添加効果

参考例4で得られた菌体10gに、50mMトリス/HCl、5mMEDTA (pH7.5) 50mLを加えて超音波破砕機(ソニファー450)(ブランソン・(株))にて4℃、5分間の菌体破砕を4回繰り返した後、遠心分離(15000rpm、30分間)を行い、沈殿画分(封入体画分)を得た。本沈殿画分を50mMトリス/HCl、5mMEDTA (pH7.5) 10mL、50mMトリス/HCl、4M尿素(pH7.

(13)

23

5) 10 ml、にて洗浄を行った後、菌体1 gより得られる沈殿画分に50 mMトリス/HCl、4 Mグアニジシ塩酸塩 (pH 7.5)、0もしくは5 mM システアミン30 mlを加えて4℃で一晩攪拌溶解した後、遠心分離 (15000 rpm、30分間) を行い上澄液を得た。本上澄液に0.8 mlに50 mMトリス/HCl、0、0.2、0.4、0.6もしくは0.8 Mアルギニン、(pH 8.0)のリフォールディング液20 mlを加えて、4℃で2日間活性化を行なった後、酢酸でpH 6に調整し、蒸留水にて4倍に希釈して遠心分離 (3000 rpm、15分間) を行い上澄液を得た。本上澄液を実施例11で示したC4P-50 (4.6 mm ID X 250 mm L、5  $\mu$ ) (昭和電工 (株)) を用いて可溶性マウスTL4量を定量した。その結果、可溶性マウスTL4収量はリフォールディング時のアルギニン添加により、著しく上昇することが分かった (図11)。\*

〔表4〕

・ アミノ酸	1 モル当たりの 残基数	可溶性マウスTL4の塩基配列 から予測される値
・ Asx	9.4	9
Thr <sup>1)</sup>	7.3	7
Ser <sup>1)</sup>	10.8	12
Glx	12.8	12
Pro	11.0	9
Gly	19.5	20
Ala	11.1	11
Cys <sup>2)</sup>	N. D.	2
Val	13.2	14
Met	3.1	2
Ile	3.9	4
Leu	20	20
Tyr	7.8	8
Phe	4.1	4
His	4.9	5
Lys	3.3	3
Arg	13.4	14
Trp	2.4	3

酸加水分解 (6N HCl-4%チオグリコール酸、110℃、24及び48時間加水分解の平均値)

1) 0時間に外挿した値

2) 未検出

約10  $\mu$ gを用いて分析を行った。

〔0048〕 (b) N末端アミノ酸配列分析  
N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー (アプライドバイオシステムモデル492) を用いて決定した。その結果、得られた可溶性マウスTL4のN末端に※

〔表5〕

24

\* さらに、このアルギニン添加と抽出時のシステアミン添加を組み合わせることにより、両者が相乗的に作用して可溶性マウスTL4収量の飛躍的な増大をもたらすことも分かった (図11)。なお、可溶性マウスTL4収量に対する抽出時のシステアミン至適濃度は5 mM、リフォールディング時のアルギニン至適濃度は0.8 Mであった。

〔0046〕 実施例13 可溶性マウスTL4の蛋白化学的分析

〔a〕 アミノ酸組成分析

実施例10で得られた可溶性マウスTL4について、そのアミノ酸組成値をアミノ酸分析計 (ベックマンシステム6300E) を用いて決定した。その結果、本標品の測定値は、N末端にMetが付加された可溶性マウスTL4のアミノ酸組成の理論値と一致した (表4)。

〔0047〕

※はMetが付加されていることの他は塩基配列から推定された可溶性マウスTL4のN末端アミノ酸配列と一致した (表5)。

〔0049〕

(14)

25

26

残基No.	検出された PTH <sup>1)</sup> - アミノ酸 (pmol)	可溶型マウスTL4の塩基配列 から予測される アミノ酸
1	Met (34)	
2	Leu (31)	Leu
3	Ile (35)	Ile
4	Gln (24)	Gln
5	Glu (20)	Glu
6	Gln (20)	Gln
7	Arg (15)	Arg
8	Ser (11)	Ser
9	His (6.4)	His
10	Gln (9.5)	Gln

1) フェニールチオヒダントイン

100 pmolを用いて分析を行った。

・【0050】

・【発明の効果】本発明では遺伝子工学を用いて原核細胞中に発現した組み換え型タンパク質の不活性体を効率よく活性化でき、上記のような作用を有する生物学的、薬理学的に活性な組み換え型タンパク質を大量に調製できる。このようにして得られる活性なタンパク質のなかでも、例えば、Fasリガンド様タンパク質であるTL4\*

\*は、抗ガン剤として癌（乳癌、前立腺癌、大腸癌、胃癌など）、免疫調節剤として癌、ウイルス感染、腎炎、自己免疫疾患、リウマチ関節炎など、肝臓機能調節剤として肝炎などに対する治療薬として有用である。

・【0051】

・【配列表】

[Sequence Listing]

&lt;110&gt; Takeda Chemical Industries, Ltd.

&lt;120&gt; Method for Producing of a Recombinant Protein

&lt;130&gt; B01112

&lt;150&gt; JP 12-097891

30

&lt;151&gt; 2000-03-30

&lt;160&gt; 6

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 240

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 1

Met Glu Glu Ser Val Val Arg Pro Ser Val Phe Val Val Asp Gly Gln

1 5 10 15

Thr Asp Ile Pro Phe Thr Arg Leu Gly Arg Ser His Arg Arg Gln Ser

20 25 30

Cys Ser Val Ala Arg Val Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu Met Gly

35 40 45

Ala Gly Leu Ala Val Gln Gly Trp Phe Leu Leu Gln Leu His Trp Arg

50 55 60

Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp Gly Pro Ala Gly Ser Trp

65 70 75 80

Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser His Glu Val Asn Pro Ala Ala

85 90 95

His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Leu

(15)

27 100 105 110 28  
 Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr  
 115 120 125  
 His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys Ala Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr  
 130 135 140  
 Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys Pro Leu Gly Leu Ala Ser  
 145 150 155 160  
 Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Pro Arg Tyr Pro Glu Glu  
 165 170 175  
 Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser Pro Cys Gly Arg Ala Thr Ser  
 180 185 190  
 Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe Leu Gly Gly Val Val His  
 195 200 205  
 Leu Glu Ala Gly Glu Lys Val Val Val Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu  
 210 215 220  
 Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val  
 225 230 235 240  
 <210> 2  
 <211> 27  
 <212> DNA 20  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223>  
 <400> 2  
 tatacatatg atacaagagc gaaggtc 27  
 <210> 3  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220> 30  
 <223>  
 <400> 3  
 agccggatcc gacctcacac catgaaa 27  
 <210> 4  
 <211> 239  
 <212> PRT  
 <213> Mouse  
 <400> 4  
 Met Glu Ser Val Val Gln Pro Ser Val Phe Val Val Asp Gly Gln Thr  
 1 5 10 15  
 Asp Ile Pro Phe Arg Arg Leu Glu Gln Asn His Arg Arg Arg Arg Cys  
 20 25 30  
 Gly Thr Val Gln Val Ser Leu Ala Leu Val Leu Leu Leu Gly Ala Gly  
 35 40 45  
 Leu Ala Thr Gln Gly Trp Phe Leu Leu Arg Leu His Gln Arg Leu Gly  
 50 55 60  
 Asp Ile Val Ala His Leu Pro Asp Gly Gly Lys Gly Ser Trp Glu Lys  
 65 70 75 80  
 Leu Ile Gln Asp Gln Arg Ser His Gln Ala Asn Pro Ala Ala His Leu  
 85 90 95

29

30

```

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223>
<400> 5
ggcatatgct gatacaagat caacgatctc
30
<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
30
<220>
<223>
<400> 6
cggatcctca gaccatgaaa gctccgaaat
30

```

・【図 7】図 7 は、可溶型マウス T L 4 (Leu81-Val239) のアミノ酸配列を示す。

・【図 8】図 8 は、プラスミド p T C II m T L 4 の構築図を示す。

・【図 9】図 9 は、可溶型マウス T L 4 の精製標品の S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動での挙動を示す。レーン 1 は分子量マーカーを、レーン 2 は可溶型マウス T L 4 の精製標品を示す。ゲルはマルチゲル 15 / 25。

・(第一化学薬品 (株)) を使い、クーマシー・ブリリアント・ブルーで染色を行った。

・【図 10】図 10 は、可溶型マウス T L 4 の精製標品のイオン交換 H P L C および逆相 H P L C での溶出パターンを示す。

・【図 11】図 11 は、可溶型マウス T L 4 の収量に及ぼす抽出時のシステアミン添加効果およびリフォールディング時のアルギニン添加効果を示す。

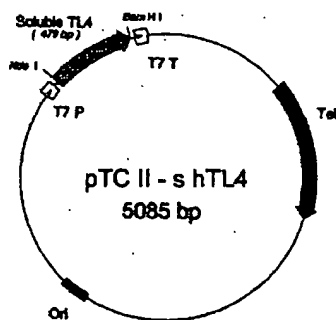


(17)

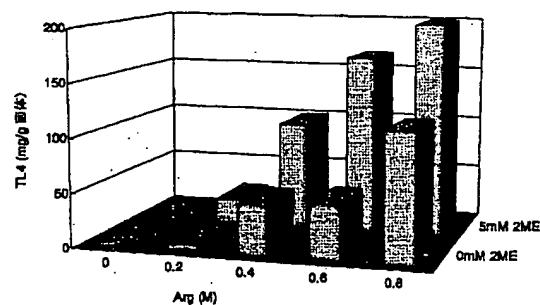
〔図1〕

Ile Gln Glu Arg Arg Ser His Glu Val Asn Pro Ala Ala  
 84 85 90 95  
 His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Leu  
 100 105 110  
 Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr  
 115 120 125  
 His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys Ala Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr  
 130 135 140  
 Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys Pro Leu Gly Leu Ala Ser  
 145 150 155 160  
 Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Pro Arg Tyr Pro Glu Glu  
 165 170 175  
 Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser Pro Cys Gly Arg Ala Thr Ser  
 180 185 190  
 Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe Leu Gly Gly Val Val His  
 195 200 205  
 Leu Glu Ala Gly Glu Lys Val Val Val Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu  
 210 215 220  
 Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val  
 225 230 235 240

〔図2〕

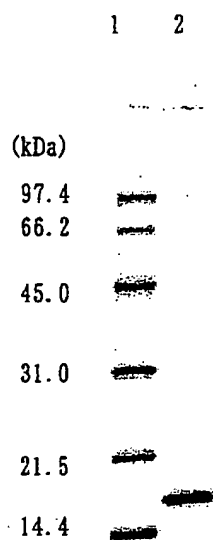


〔図5〕

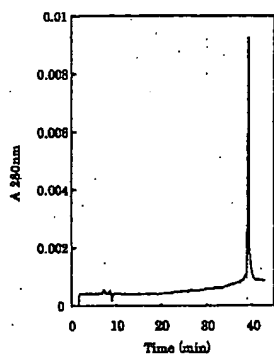


(18)

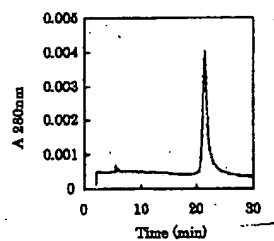
・[図 3]



・[図 4]

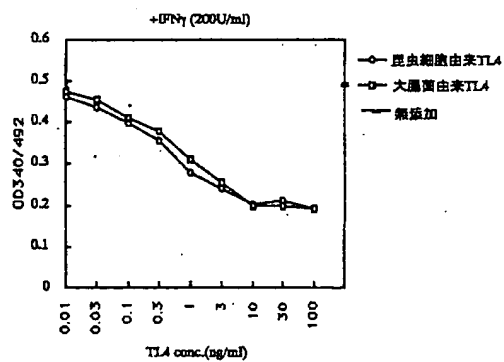


C4P-50

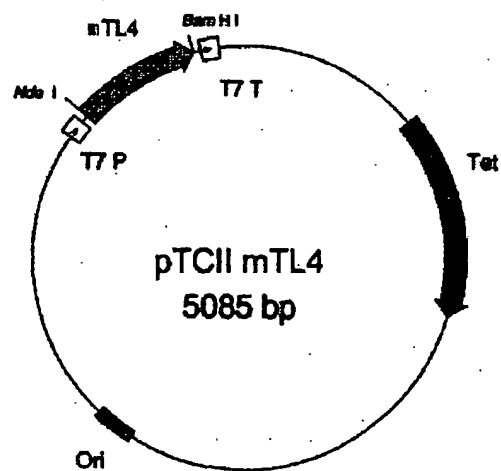


CM-5PW

・[図 6]



・[図 8]

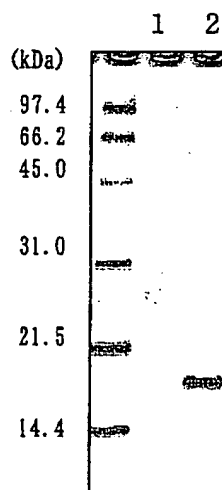


(19)

-[図7]

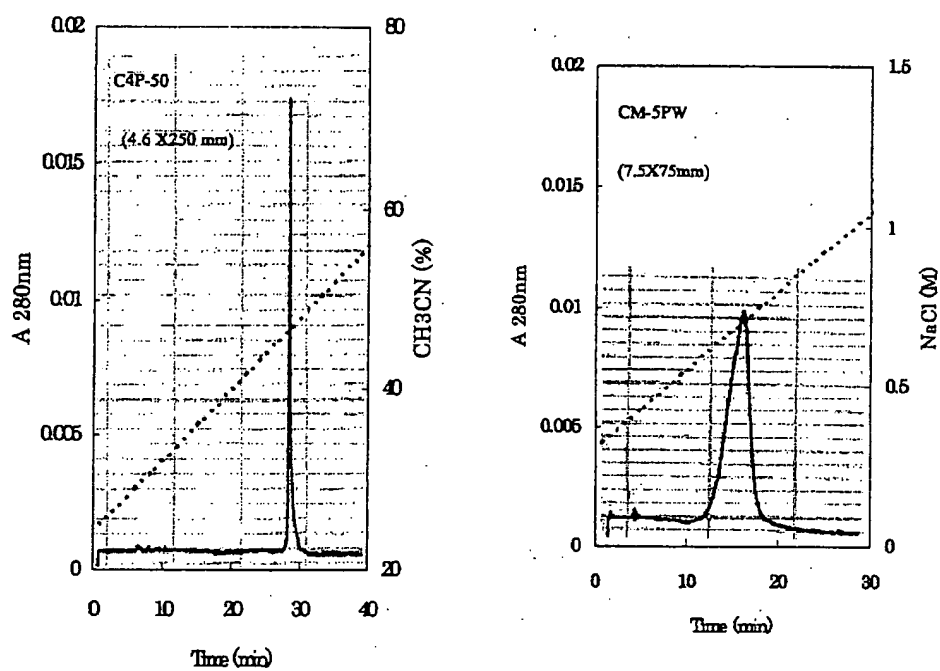
Leu Ile Gln Asp Gln Arg Ser His Gln Ala Asn Pro Ala Ala His Leu Thr Gly Ala Asn		
81	90	100
Ala Ser Leu Ile Gly Ile Gly Gly Pro Leu Leu Trp Glu Thr Arg Leu Gly Leu Ala Phe		
101	110	120
Leu Arg Gly Leu Thr Tyr His Asp Gly Ala Leu Val Thr Met Glu Pro Gly Tyr Tyr Tyr		
121	130	140
Val Tyr Ser Lys Val Gln Leu Ser Gly Val Gly Cys Pro Gln Gly Leu Ala Asn Gly Leu		
141	150	160
Pro Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Ser Arg Tyr Pro Lys Glu Leu Glu Leu Leu		
161	170	180
Val Ser Arg Arg Ser Pro Cys Gly Arg Ala Asn Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser		
181	190	200
Phe Leu Gly Gly Val Val His Leu Glu Ala Gly Glu Glu Val Val Val Arg Val Pro Gly		
201	210	220
Asn Arg Leu Val Arg Pro Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val		
221	230	239

-[図9]



(20)

・[図10]



・[図11]

